

УДК 577.3

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ФОТОХИМИОТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ – ПРОИЗВОДНЫХ НИТРОФУРАНА

© 2022 г. Г.Ж. Парра\*, Л.П. Феррейра\*\*, Г.П. Борисевич\*\*\*, Ю.Е. Борисевич\*\*\*, #

\**Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500 – Butantã, São Paulo 05503-900, Brazil*

\*\**Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, Av. Prof. Roberto Frade Monte, 389 – Aeroporto, Barretos – SP, 14783-226, Brazil*

\*\*\**Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brazil*

#*E-mail: iourib@ffclrp.usp.br*

Поступила в редакцию 26.08.2022 г.

После доработки 26.08.2022 г.

Принята к публикации 29.08.2022 г.

Фотохимиотерапия – в настоящее время метод лечения различных заболеваний, включая онкологические, в форме фотодинамической терапии. В организм вводится фотосенсибилизатор, который накапливается в больной ткани. Облучение видимым светом переводит накопленный фотосенсибилизатор в электронно-возбужденные состояния, которые, взаимодействуя с кислородом, переводят его в активные формы, разрушающие больные клетки. Однако энергия электронного возбуждения может расходоваться путем флуоресценции и внутренней и интеркомбинационной конверсий. Это ограничивает эффективность фотодинамической терапии, стимулируя поиск альтернативных путей фотохимиотерапии, с использованием невозбужденных активных частиц, например, свободных радикалов. Среди свободных радикалов интересен радикал  $\text{NO}^{\cdot}$ , в малых концентрациях участвующий во многих жизненно важных процессах, а в высоких концентрациях вызывающий гибель клеток. Среди различных классов фотосенсибилизаторов, способных к фотовысвобождению  $\text{NO}^{\cdot}$ , внимание привлекают производные нитрофурана. Представитель этого класса нитрофурантоин, применяемый как лекарство в урологии, продемонстрировал высокую фотоактивность против ряда раковых клеток и бактерий.

*Ключевые слова: фотохимиотерапия, альтернативные механизмы, производные нитрофурана, фотовысвобождение  $\text{NO}^{\cdot}$ , нитрофурантоин.*

DOI: 10.31857/S000630292206014X, EDN: LKQTRP

*Мне странно, когда кто-то называет себя ученым...*

*Кто такие эти «ученые»?*

*Я знаю только одного – «кота ученого»!*

*Л.А. Блюменфельд*

*Фундаментальная наука – штука, конечно, увлекательная.*

*Вон Милликен, к примеру, уйму времени потратил,*

*определяя заряд электрона. Но надо же помнить*

*и о больных и умирающих людях, которые ждут нашей помощи.*

*С.Э. Шноль*

*(из беседы со студентами-биофизиками)*

Фотохимиотерапия – неинвазивная медицинская технология, применяемая при лечении рака, грибковых, бактериальных и вирусных заболева-

ний, в настоящее время – в форме фотодинамической терапии [1, 2]. Эта технология основана на введении в организм пациента фотоактивного ве-

*Сокращения: ФС – фотосенсибилизатор, НФТ – нитрофурантоин, МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид, СТЕ – цитотоксический эффект (cytotoxic effect).*

щества (фотосенсибилизатора, ФС), который накапливается в больной ткани, и последующем облучении этой ткани видимым светом. Поглощение квантов видимого света переводит накопленный ФС в электронно-возбужденные синглетное и триплетное состояния, которые, взаимодействуя с молекулярным кислородом, формируют его активные состояния, такие как синглетно-возбужденное состояние «синглетный кислород», анион супероксид и т. д., разрушающие больные клетки в результате прямых или вторичных реакций, в частности, цепных [1–3]. Преимуществами фотохимиотерапии по сравнению с классическими методами радио- и химиотерапии является отсутствие негативных побочных эффектов, поскольку, в отличие от химиотерапевтических препаратов, ФС не являются токсичными в невозбужденном состоянии, а видимый свет также не представляет опасности для организма пациента. Привлекательной является также техническая простота метода. Надо отметить, что в последнее время проводятся исследования по применению фотохимиотерапии в сельскохозяйственной ветеринарии с использованием Солнца в качестве естественного источника видимого облучения.

Однако эффективность фотохимиотерапии в форме фотодинамической терапии ограничивается рядом факторов. Дело в том, что энергия электронно-возбужденных состояний как ФС, так и кислорода, кроме желательных реакций, может расходоваться путем излучательной (флуоресценция) и безизлучательной (внутренняя и интеркомбинационная конверсия) релаксации [4]. Кроме того, для раковых тканей характерно низкое содержание молекулярного кислорода, что понижает вероятность его реакции с возбужденными состояниями ФС. Эти факторы ограничивают эффективность фотодинамической терапии, стимулируя поиск альтернативных путей фотохимиотерапии, не требующих участия молекулярного кислорода и возбужденных состояний ФС. Одним из возможных путей может быть использование в качестве активных частиц свободных радикалов, высвобождаемых под действием видимого света.

Среди свободных радикалов особый интерес представляет нитроксильный радикал  $\text{NO}^\bullet$ , в низких концентрациях участвующий во многих жизненно важных процессах, а в высоких концентрациях вызывающий гибель клеток [5–7]. Задача сводится к поиску ФС, высвобождающих  $\text{NO}^\bullet$  под действием света [8–10]. Среди различных ФС, возможных фотодоноров  $\text{NO}^\bullet$ , особое внимание привлекают производные нитрофурана, такие как фурацилин, нитрофурантоин, фуразолидон, фуразидин, нифуроксазид, хинифурил. Привлекательность этих веществ в том, что они

уже широко используются в медицине, главным образом как бактерицидные, противогрибковые и противовоспалительные препараты, механизм которых основан на высвобождении  $\text{NO}^\bullet$  в процессе их метаболизма [11]. Кроме того, в отличие от применяемых в настоящее время ФС, они дешевы и широкодоступны, что важно для их применения особенно в ветеринарии.

Интенсивная, главным образом желто-зеленая окраска производных нитрофурана указывает на наличие оптического поглощения в видимой части спектра, что говорит о возможности их фотореакций при облучении видимым светом.

Ранее мы обнаружили высокую фотоактивность бактерицидного препарата хинифурила против лейкемии мышей P388 [12, 13] и установили, что она обусловлена формированием при фотовозбуждении трех активных частиц: радикала  $\text{NO}^\bullet$ , синглетного кислорода и анион супероксида [13].

Другим представителем этого класса является нитрофурантоин, который привлекает внимание из-за широкого променения в качестве лекарственного препарата в урологии [14], а также в сельском хозяйстве, как обеззараживающая добавка к кормам сельскохозяйственных животных [15]. В наших исследованиях мы установили его высокую фотоактивность против ряда раковых клеток и бактерий.

В данной статье мы представляем результаты исследования фотоактивности нитрофурантоина против клеток *murine melanoma B16F10*, а также обсуждаем возможные механизмы его фотоактивности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах был использован нитрофурантоин (НФТ, рис. 1) производства Sigma Chemical Co (США). НФТ плохо растворим в воде, поэтому его исходный раствор приготавливали в диметилсульфоксиде.

Спектральные и фотофизические характеристики НФТ были исследованы в фосфатном буфере при pH 7.2 и в этиловом спирте.

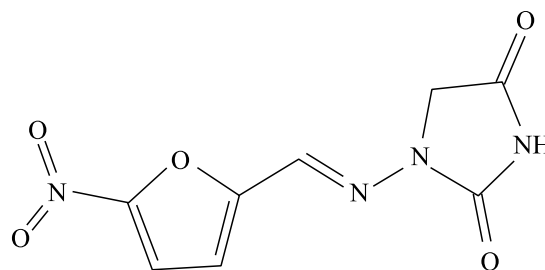


Рис. 1. Структурная формула нитрофурантоина.

Кинетику формирования и диссипации нитроксильного радикала  $\text{NO}^{\cdot}$  и его квантовый выход ( $\Phi_{\text{NO}}$ ) определяли методом хемилюминесценции [16].

Детектирование синглетного кислорода осуществляли путем регистрации во времени его фосфоресценции при  $\lambda = 1270$  нм [17].

**Эксперименты с культурой клеток *murine melanoma B16F10*.** Методика экспериментов с культурой клеток *murine melanoma B16F10* детально описана в работе [18]. Была использована культура клеток из «American Type Culture Collection» (Rockville, MD, США). Перед использованием в экспериментах с культурой клеток основной раствор НФТ (21 мМ в диметилсульфоксиде) был солибилизован в среде RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, США).

Клетки выращивали в среде RPMI 1640 с фетальным красным с добавкой 10% Fetal Calf Serum, глутамина и антибиотиков при 35°C во влажной среде, содержащей 5%  $\text{CO}_2$  и 95% воздуха. Все реагенты получены от Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA, США).

Осевшие клетки отмывали дважды в фосфатном буфере, а затем диспергировали в трипсин-ЭДТА (2.5 г/л, Sigma-Aldrich, США), центрифугировали при 1100 об/мин в течение 8 мин при 10°C в полной среде и высевали. Клетки распределяли на подложки с 96 ячейками по 0.2 мл среды при плотности  $2 \cdot 10^4$  клеток на каждую ячейку. После 24 ч роста из ячеек удаляли среду и добавляли свежую среду RPMI с различным содержанием НФТ (0.1–100 мкМ). Клетки инкубировали,

а затем растворы сенсibilизатора удаляли и добавляли свежую среду. Для экспериментов со светом была использована среда RPMI, свободная от красного фенола, поскольку часть его спектра поглощения совпадает со спектром НФТ.

**Определение фототоксичности.** Для светового облучения культуры на подложках с 96 ячейками использовали источник из 96 светодиодов с длиной волны излучения 385 нм, распределенных равномерно по поверхности. Интенсивность света измеряли радиометром USB4000 (Ocean Optics, США), а время облучения выбирали так, чтобы получить дозы 2, 6 и 12 Дж/см<sup>2</sup>. Были проделаны контрольные эксперименты, а именно: ячейки, содержащие клетки без сенсibilизатора и без облучения (контроль 0); ячейки с клетками, обработанные сенсibilизатором, но без облучения (контроль 1); ячейки с облученными клетками без сенсibilизатора (контроль 2).

Тест на выживание клеток был проделан с применением 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) в соответствии с методикой, описанной Моссманом [19]. МТТ добавляли к образцу после 24-часовой инкубации с НФТ в темноте или после облучения светом. В каждую ячейку добавляли 200 мкл раствора RPMI-МТТ (0.5 мг/мл) и через 3 ч заменяли на 200 мкл диметилсульфоксида.

Величину оптической плотности в ячейках определяли при длине волны 492 нм с помощью Thermoplate Reader<sup>®</sup>. Цитотоксический эффект (cytotoxic effect, СТЕ) рассчитывали по формуле:

$$\text{СТЕ}(\%) = \left( 1 - \frac{\text{Оптическое поглощение обработанных клеток}}{\text{Оптическое поглощение необработанных клеток}} \right) \times 100.$$

Летальные концентрации НФТ в темноте ( $\text{IC}_{50}$ ) и при световом облучении ( $\text{LD}_{50}$ ) определяли из зависимости СТЕ от концентрации НФТ. Все результаты представлены как средние по 3 экспериментам величины СТЕ с ошибкой, полученные для 18 индивидуальных ячеек.

**Проникновение НФТ в клетки, его внутриклеточная локализация и определение внутриклеточного  $\text{NO}^{\cdot}$  с помощью флуоресцентной микроскопии.** Эксперименты были проведены с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti, оборудованного инкубационной системой «stage top». Были использованы специфические красители для клеточных органелл. Митохондрии окрашивали с помощью родамина 123, а для ядер был использован препарат Hoechst (оба – Sigma, США). В качестве индикатора образования  $\text{NO}^{\cdot}$  в клетках был использован диаминофлуоресцеин в форме диацетата, гарантирующей его проникновение в клетку [20].

Во всех флуоресцентных экспериментах клетки выращивали в чашках Петри и тщательно промывали после инкубации и перед экспериментами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Спектральные и фотофизические характеристики НФТ.** Спектральные и фотофизические характеристики НФТ были впервые детально изучены в работе [21].

Спектры оптического поглощения и флуоресценции НФТ в фосфатном буфере при pH 7.2 представлены на рис. 2. НФТ имеет два интенсивных пика оптического поглощения в фиолетовой и близкой ультрафиолетовой спектральных областях с коэффициентами молярного поглощения  $\epsilon_{378\text{nm}} = 1.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  и  $\epsilon_{273\text{nm}} = 1.0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

При облучении светом в области оптического поглощения раствор НФТ излучает очень слабую

флуоресценцию с максимумом при  $\lambda = 544$  нм (рис. 2) и квантовым выходом  $\phi_{\text{фл}} = (3.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-4}$  [21]. Кинетическая кривая затухания флуоресценции имеет биэкспоненциальный характер с временами жизни  $\tau_1 = 1.3 \pm 0.3$  нс и  $\tau_2 = 0.030 \pm \pm 0.003$  нс [21]. Тем не менее, наличие собственной, хотя и слабой, флуоресценции позволило установить места локализации НФТ внутри клетки.

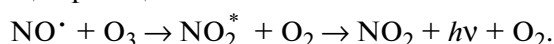
Методом импульсного фотолиза [22, 23] было зарегистрировано формирование триплетного состояния НФТ с крайне низким квантовым выходом ( $\phi_T \approx (1-5) \cdot 10^{-6}$ ) и со временем жизни в отсутствие молекулярного кислорода  $\tau_T = 0.2 \pm 0.1$  мкс [21]. Триплетное состояние тушится молекулярным кислородом с бимолекулярной константой тушения  $k_q = (1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$  [21], характерной для процессов, контролируемых диффузией [4, 24]. Тушение сопровождается формированием синглетного кислорода. Однако интенсивность излучения при  $\lambda = 1270$  нм находилась на уровне шумов, что не позволило достоверно определить величину квантового выхода синглетного кислорода даже при насыщении раствора кислородом.

Обычно времена жизни триплетных состояний органических молекул, включая производные нитрофурана [4, 13], в растворах находятся в интервале от десятков микросекунд до миллисекунд. Столь короткие времена жизни НФТ, а также низкие квантовые выходы его флуоресценции и триплетного состояния, указывают на наличие альтернативных мономолекулярных процессов диссипации энергии электронного возбуждения НФТ. Одним из таковых может являться фотоизомеризация молекулы НФТ, что характерно для молекул, в структуре которых присутствует цепь  $\pi$ -сопряжения [25].

Другая возможность диссипации энергии электронного возбуждения НФТ — фотовысвобождение радикала  $\text{NO}^{\cdot}$ , аналогично наблюдающемуся в случае хинифурила [13].

Чтобы проверить эту гипотезу, были проделаны эксперименты по регистрации  $\text{NO}^{\cdot}$  при облучении буферных растворов НФТ.

**Фотовысвобождение  $\text{NO}^{\cdot}$ .** Детектирование  $\text{NO}^{\cdot}$  при облучении растворов НФТ видимым светом в диапазоне 400–450 нм проводили хемилуминесцентным методом в соответствии со следующей реакцией:



На рис. 3а представлена кривая формирования и расходования  $\text{NO}^{\cdot}$  в зависимости от времени облучения.

Параллельно с формированием радикала  $\text{NO}^{\cdot}$  мы наблюдали изменение оптического по-

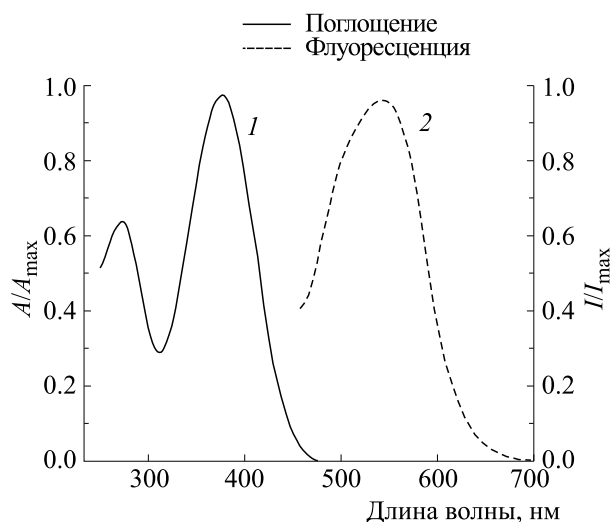


Рис. 2. Нормированные спектры оптического поглощения и флуоресценции нитрофурантоина при pH 7.2 [21].

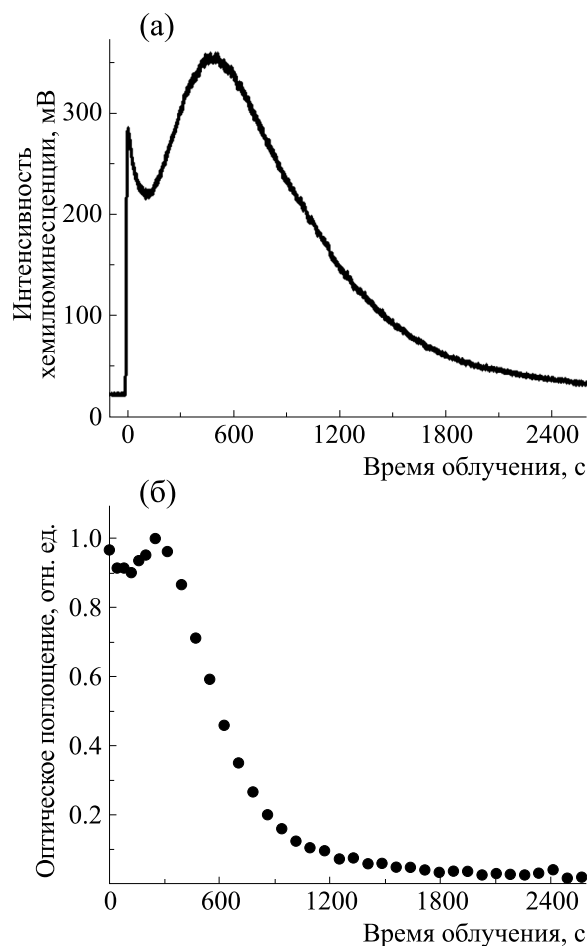


Рис. 3. (а) — Зависимость от времени облучения интенсивности хемилуминесценции буферного раствора нитрофурантоина, вызванной фотовысвобождением радикала  $\text{NO}^{\cdot}$ ; (б) — Зависимость от времени облучения нормализованного оптического поглощения раствора нитрофурантоина при  $\lambda = 355$  нм.

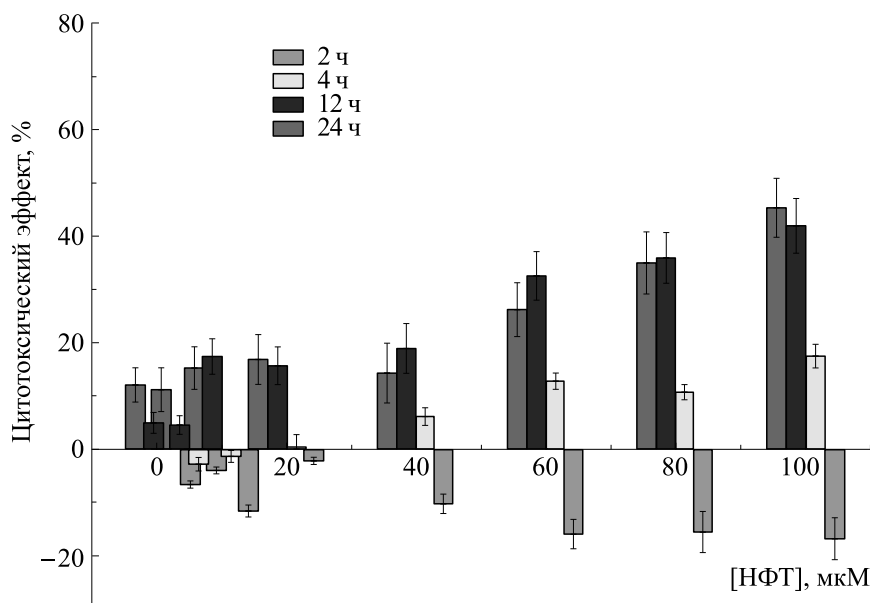


Рис. 4. Цитотоксический эффект нитрофурантоина против клеток B16F10 через 2, 4, 12 и 24 ч инкубации в темноте [18].

глошения НФТ, временная зависимость которой (рис. 3б) подобна временной зависимости концентрации  $\text{NO}^{\bullet}$ .

Сложный характер этих кривых говорит о том, что фототрансформация НФТ и, соответственно, фотовысвобождение  $\text{NO}^{\bullet}$  происходят в несколько этапов. Полная схема этих процессов нуждается в дополнительном исследовании, однако факт фотовысвобождения  $\text{NO}^{\bullet}$  сомнений не вызывает. Основываясь на этом факте можно было ожидать, что НФТ будет проявлять фотоцитотоксичность. Это предположение было подтверждено экспериментами с клетками *murine melanoma B16F10* [18].

**Интернализация НФТ и его локализация внутри клеток *murine melanoma B16F10*.** Прежде всего было проведено исследование кинетики проникновения НФТ внутрь клеток (интернализация) и его локализации по отношению к внутриклеточным структурам [18]. Эти исследования были проведены с помощью флуоресцентной микроскопии.

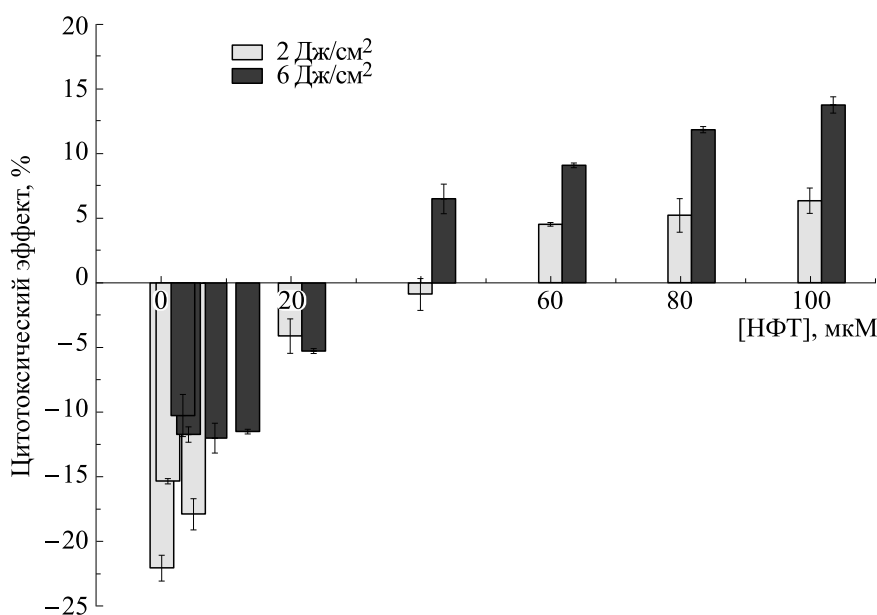
Клетки инкубировали с НФТ в концентрации 20 мкМ в течение 1, 2, 4 и 24 ч; флуоресценция НФТ в клеточной среде для разных времен инкубации ( $t_{\text{инк}}$ ) была визуализирована с использованием соответствующих фильтров.

При временах инкубации  $t_{\text{инк}}$ , меньших 4 ч, интенсивность флуоресценции НФТ в клетках была очень слабой и диффузной. При повышении  $t_{\text{инк}}$  наблюдался рост интенсивности флуоресценции и ее локализация в определенных органеллах внутри клетки, что указывает на увеличение концентрации НФТ внутри клетки и его связывание с клеточными структурами. Сравне-

ние локализации НФТ с локализацией маркеров ядер и митохондрий показало, что распределение в клетках НФТ и родамина 123 одинаково, а именно, что оба они связываются с митохондриями, но избегают клеточных ядер, с которыми связывается краситель Hoechst.

**Высвобождение  $\text{NO}^{\bullet}$  при облучении НФТ внутри клетки.** При облучении культуры клеток с НФТ светом с длиной волны 385 нм наблюдается уменьшение флуоресценции НФТ, что свидетельствует о его фототрансформации. Параллельно с уменьшением флуоресценции НФТ, в клетке наблюдается формирование  $\text{NO}^{\bullet}$ , которое фиксировалось с помощью диацетата диаминофлуоресцеина, специфического флуоресцентного маркера внутриклеточного  $\text{NO}^{\bullet}$  [20]. Клетки инкубировали с НФТ в течение 6 часов и коинкубировали с диаминофлуоресцеином в течение 10 мин. Интенсивность флуоресценции диаминофлуоресцеина возрастает с ростом дозы облучения, доказывая таким образом, что источником  $\text{NO}^{\bullet}$  в клетках действительно является НФТ, преобразующийся под действием света.

**Цитотоксичность НФТ по отношению к клеткам *murine melanoma B16F10* в темноте и на свету.** На рис. 4 представлены данные по цитотоксическому эффекту НФТ в темноте в зависимости от времени инкубации. Для  $t_{\text{инк}} = 2$  ч НФТ не проявляет цитотоксичности во всем диапазоне использованных концентраций (0.1–100 мкМ). Более того, наблюдается пролиферация клеток, увеличивающаяся с ростом концентрации НФТ. Для  $t_{\text{инк}} = 4$  ч пролиферация клеток уменьшается с ростом концентрации НФТ вплоть до ее критического зна-



**Рис. 5.** Цитотоксический эффект нитрофурантоина против клеток V16F10 после двухчасовой инкубации и последующего облучения светом 385 нм с дозами 2 и 6 Дж/см<sup>2</sup> [18].

чения  $[НФТ]_{кр} \approx 40$  мкМ, при которой не наблюдаются ни пролиферация, ни токсичность. Для  $[НФТ] > [НФТ]_{кр}$  наблюдается только токсичность, а СТЕ увеличивается с ростом концентрации НФТ. Для  $t_{инк}$  12 и 24 ч наблюдается только цитотоксичность и СТЕ растет с ростом концентрации НФТ.

При облучении образцов, содержащих НФТ, светом с длиной волны 385 нм для  $t_{инк} = 2$  ч при облучении (рис. 5) НФТ в концентрациях ниже 40 мкМ вызывает пролиферацию вплоть до дозы облучения 2 Дж/см<sup>2</sup>. Для более высоких концентраций наблюдается гибель клеток, причем СТЕ растет с увеличением содержания НФТ. Для дозы 6 Дж/см<sup>2</sup> наблюдается аналогичное поведение, однако пролиферация менее эффективна, токсический эффект появляется при меньших концентрациях НФТ, а СТЕ превышает наблюдаемый при 2 Дж/см<sup>2</sup>.

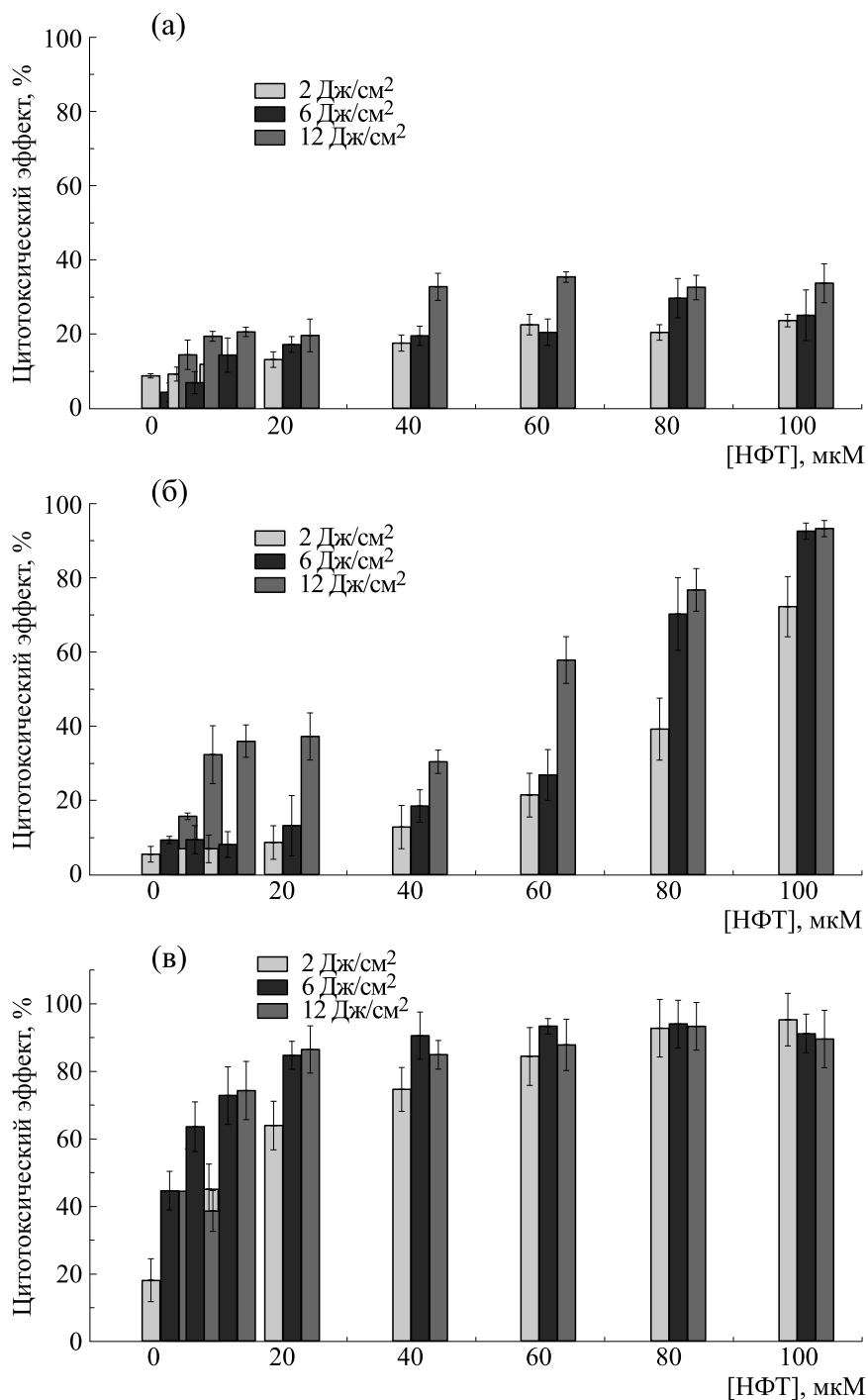
Интересно отметить, что при низких концентрациях НФТ пролиферация при облучении светом гораздо эффективнее наблюдаемой в темноте (рис. 4 и 5). Однако для времен инкубации 4, 12 и 24 ч при облучении вообще нет пролиферации, наблюдается только гибель клеток. СТЕ растет с увеличением  $t_{инк}$ , дозы облучения и концентрации НФТ (рис. 6). Для  $t_{инк} = 24$  ч и дозы 12 Дж/см<sup>2</sup> СТЕ достигает сатурации  $\approx 100\%$  уже при  $[НФТ] = 20$  мкМ, в то время как при этих условиях в темноте величина СТЕ всего около  $\approx 15\%$ .

Летальные концентрации в темноте ( $IC_{50}$ ) и при облучении светом ( $LD_{50}$ ) были получены из данных, представленных на рис. 4–6, а их соответствующие величины представлены в табл. 1.

Основываясь на приведенных данных, мы можем утверждать, что НФТ проявляет против раковых клеток V16F10 фотоцитотоксичность, многократно превосходящую его цитотоксичность в

**Таблица 1.**  $IC_{50}$  и  $LD_{50}$  нитрофурантоина для клеток V16F10 в зависимости от времени инкубации и дозы облучения [18]

Доза света, Дж/см <sup>2</sup>	$IC_{50}$ (12 ч), мкМ	$LD_{50}$ (12 ч), мкМ	$IC_{50}$ (24 ч), мкМ	$LD_{50}$ (24 ч), мкМ
0	> 100	—	> 100	—
2	—	90	—	13
6	—	70	—	6
12	—	50	—	2



**Рис. 6.** Цитотоксический эффект нитрофурантоина против клеток V16F10 после инкубации в течение 4 ч (а), 12 ч (б) и 24 ч (в) и последующего облучения светом 385 нм с дозами 2, 6 и 12 Дж/см<sup>2</sup> [18].

темноте. Фототоксичность НФТ обусловлена его фототрансформацией, сопровождающейся высвобождением радикала  $\text{NO}^{\cdot}$ . Интересен тот факт, что при низких внутриклеточных концентрациях НФТ и низких дозах облучения наблюдается эффект стимуляции роста клеток (пролиферация). Этот эффект обусловлен тем, что  $\text{NO}^{\cdot}$  в

низких концентрациях стимулирует различные биопроцессы в клетках и организме, тогда как при высоких концентрациях он их подавляет, приводя к гибели клеток [5–7].

Важно отметить также, что фототоксичность НФТ не связана с наличием или отсутствием в системе молекулярного кислорода.

В наших экспериментах мы не наблюдали разрушение клеточной мембраны. Это указывает на то, что механизм фотоцитотоксичности НФТ имеет, скорее всего, характер не некроза, а апоптоза. Это соответствует тому факту, что НФТ связан с клеточными митохондриями, а не с внешней мембраной. Однако детальный механизм фотоцитотоксичности НФТ требует дальнейшего изучения.

Недостатком НФТ как фотоактивного вещества для фотохимиотерапии является то, что спектр его оптического поглощения расположен в области 350–450 нм, т. е. вне фототерапевтического окна (600–800 нм), где биологические ткани относительно прозрачны. Поэтому его применение должно ограничиваться лечением поверхностных (кожных) заболеваний, и он не может быть использован для лечения массивных опухолей. Однако незначительные изменения в его структуре, такие как удлинение цепи  $\pi$ -сопряжения, могут привести к смещению его оптического спектра в нужную область [26]. Кроме того, нами было установлено, что как НФТ, так и хинифурил демонстрируют интенсивное двухфотонное поглощение [27], что позволяет инициировать их фотореакции при облучении квантами света с длиной волны 700–900 нм.

Представляет интерес также возможность применения НФТ в одонтологии при лечении зубных каналов, характеризующихся низким содержанием кислорода.

## ВЫВОДЫ

Основываясь на исследовании фототоксичности производных нитрофурана, нитрофурантоина и хинифурила, мы можем утверждать, что его производные представляют собой новый класс фотоактивных веществ для применения в фотохимиотерапии. Преимуществом этого класса фотоактивных веществ по сравнению классическими фотосенсибилизаторами для фотодинамической терапии является то, что их фототоксичность основана не на формировании под действием света электронно-возбужденных состояний с последующей реакцией с молекулярным кислородом и формировании его активных форм, а на фотовысвобождении нитроксильного радикала  $\text{NO}\cdot$ . Это должно увеличивать эффективность процесса, так как энергия электронно-возбужденных состояний фотосенсибилизатора и кислорода, помимо ожидаемых процессов, может быть рассеяна по альтернативным путям, как излучательным (флуоресценция), так и безызлучательным (внутренняя конверсия). Преимуществом производных нитрофурана также является то, что они относятся к легкодоступным и деше-

вым медицинским препаратам, разрешенным к использованию в медицине.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке следующих Агентств финансирования (Бразилия):

– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – гранты No. 304863/2017-3, No. 305303/2013-9;

– Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. V. Kuznetsov, Res. Practic. Med. J., **2** (4), 98 (2015).
2. J. F. Algorri, Mario Ochoa, P. Roldán-Varona, et al., Cancers **13** (17), 4447 (2021).
3. S. Kwiatkowski, В. Кнап, D. Przystupski, et. al., Biomed. Pharmacother., **106**, 1098 (2018).
4. Н. Туппо, *Молекулярная фотохимия* (Мир, М., 1967).
5. S. Moncada, R. M. Palmer, and E. A. Higgs, Pharmacol. Rev., **43** (2), 109 (1991).
6. D. D. Thomas, L. A. Ridnour, et al., Free Radic. Biol. Med., **45** (1), 18 (2008).
7. A. F. Vanin, V. A. Tronov, and R. R. Borodulin, Cell Biochem. Biophys., **79**, 93 (2021).
8. S. A. Cicillini, A. C. L. Prazias, A. C. Tedesco, et al., Polyhedron, **28**, 2766 (2009).
9. S. Gupta, N. Ahmad, and H. Mukhtar, Cancer Res., **58** (9), 1785 (1998).
10. M. Korbelik, C. S. Parkins, H. Shibuya, et al., Br. J. Cancer, **82** (11), 1835 (2000).
11. N.A. Daghasanli, M. M. Rossa, H. S. Selistre-De-Araujo, et al., J. Photochem. Photobiol. B, **75**, 27 (2004).
12. N. A. Daghasanli, I. A. Degterev, A. C. Tedesco, et al., Braz. J. Med. Biol. Res., **37**, 1873 (2004).
13. N. A. Daghasanli, I. A. Degterev, G. B. Olivera, et al., J. Photochem. Photobiol. A, **184**, 98 (2006).
14. A. Porreca, D. D'Agostino, D. Romagnoli, et al., Control Trials. Urol. Int., **105** (7–8), 531 (2021).



15. M. Vass, K. Hruska, and M. Franek, *Veterinari Medicina*, **53**, 469 (2008).
16. *Nitric Oxide Analyser (NOA 280). Operation and Service Manual*, Ed. by P. M. Sievers, (Software Version 2.05, Sievers, USA, 1997).
17. А. А. Красновский, А. С. Бендикис и А. С. Козлов, *Биохимия*, **84** (2), 240 (2019).
18. L. P. Ferreira, G. G. Parra, D. C. K. Codognato, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **16**, 1071 (2017).
19. T. Mosmann, *J. Immunol. Meth.* **65** (1–2), 55 (1983).
20. T. Nagano and T. Yoshimura, *Chem. Rev.* **102**, 1235 (2002).
21. G. G. Parra, L. P. Ferreira, D. C. K. Codognato, et al., *Lumin.*, **185**, 10 (2017).
22. G. Porter, *Science*, **160**, 1299 (1968).
23. Y. E. Borissevitch, A. S. Tatikolov, and V. A. Kuzmin, *High Energy Chem.*, **5**, 474 (1978).
24. Дж. Лакович, *Основы флуоресцентной спектроскопии* (Мир, М., 1986).
25. P. Russegger, *Chem. Phys. Lett.*, **69** (2), 362 (1980).
26. Новый справочник химика и технолога, под ред. Ю. В. Поконова (Мир и семья, М., 2005), гл. 4.3.5.2. Полиметиновые красители. [http://chemanalytica.com/book/novyy\\_spravochnik\\_khimi-ka\\_i\\_tekhnologa/12\\_obshchie\\_svedeniya/6152](http://chemanalytica.com/book/novyy_spravochnik_khimi-ka_i_tekhnologa/12_obshchie_svedeniya/6152).
27. L. De Boni, D. S. Correa, D. L. Silva, et al., *J. Chem. Phys.*, **134**, 014509 (2011).

## Alternative Photosensitizers for Photochemotherapy Based on Medicinal Drugs That are Derivatives of Nitrofuran

**G.G. Parra\*, L.P. Ferreira\*\*, G.P. Borissevitch\*\*\*, and I.E. Borissevitch\*\*\***

*\*Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500 – Butantã, São Paulo 05503-900, Brazil*

*\*\*Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, Av. Prof. Roberto Frade Monte, 389 – Aeroporto, Barretos – SP, 14783-226, Brazil*

*\*\*\*Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brazil*

Photochemotherapy is now a method for treating different diseases, which include cancer, and employing a photosensitizers used for photodynamic therapy. A photosensitizer, upon its introduction into the organism, is accumulated in the diseased tissue. Irradiation of the photosensitizer by visible light results in the formation of the electronically excited state of the accumulated photosensitizer; this state undergoes reactions in the presence of oxygen to form reactive active species which destroys diseased cells. However, the excited state energy can also dissipate through fluorescence and internal and intercombination conversions. This limits the efficiency of photodynamic therapy, stimulating a search for alternative pathways in photochemotherapy, using unexcited active particles, for example, free radicals. Among free radicals,  $\text{NO}^\bullet$  radical is of a special interest as in low concentrations it takes part in many vital processes, and elevated levels of this radical is a cause of cell death. Nitrofurantoin derivatives receive attention out of the different classes of photosensitizers, that lead to release of  $\text{NO}^\bullet$  under light. One of them, nitrofurantoin, used as a drug in treatment of urinary infections, demonstrates high photoactivity against a number of cancer cells and bacteria.

*Keywords: photochemotherapy, alternative mechanisms, nitrofurantoin derivatives,  $\text{NO}^\bullet$  photorelease, nitrofurantoin*